

TI Preparation of protein and polypeptide mercapto group PEGylation reagent

IN Liu, Xinyuan; Tang, Wei

PA Shanghai Biochemistry Inst., Chinese Academy of Sciences, Peop. Rep. China

SO Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu, 9 pp.

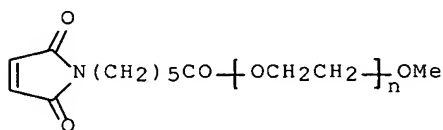
CODEN: CNXXEV

DT Patent

LA Chinese

FAN.CNT 1

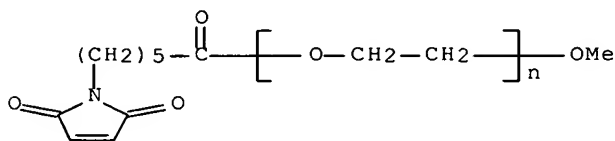
	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	CN 1110681	A	19951025	CN 1994-112129	19940420
PRAI	CN 1994-112129		19940420		
OS	CASREACT 124:316978				
GI					



I

AB The title compd. (I), useful as a PEGylation reagent for mercapto group of protein or polypeptides, was prepd. by condensation of 6-maleimidocaproic acid with polyethylene glycol monomethyl ether using dimethylaminopyridine as catalyst and DCC as condensation agent at -20-10.degree.. Thus, reaction of 1 g 6-maleimidocaproic acid with 5 g polyethylene glycol monomethyl ether (mol. wt. 5000) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in the presence of dimethylaminopyridine and DCC at -20-10.degree. gave, after purifn. With Sephadex G-25 column, 5 g I.

CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[6-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)-1-oxohexyl]-.omega.-methoxy- (9CI) (CA INDEX NAME)



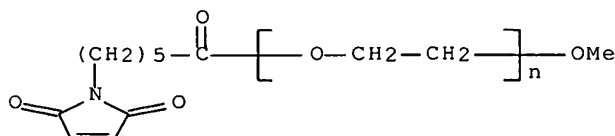
IT 158532-01-5DP, conjugates with mercapto-contg. proteins

RL: SPN (Synthetic preparation); PREP (Preparation)

(prepn. of protein and polypeptide mercapto group PEGylation reagent)

RN 158532-01-5 HCAPLUS

CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[6-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)-1-oxohexyl]-.omega.-methoxy- (9CI) (CA INDEX NAME)





# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94112129.1

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

C07D207 / 452

[43]公开日 1995 年 10 月 25 日

[22]申请日 94.4.20

[71]申请人 中国科学院上海生物化学研究所

地址 200031上海市岳阳路320号

[72]发明人 刘新垣 唐 微

[74]专利代理机构 中国科学院上海专利事务所

代理人 衷诚宜 汪克臻

C07K 1 / 107 C12P 21 / 00

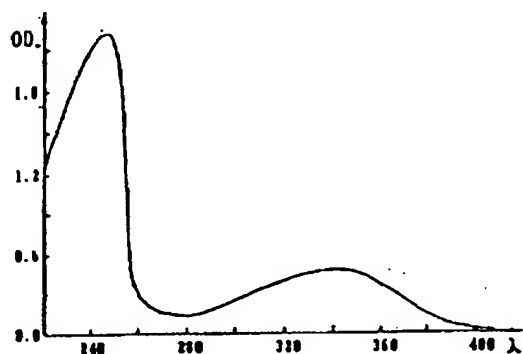
说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 一种新型的蛋白质及多肽巯基聚乙二醇(PEG)化试剂

[57]摘要

本发明为一种新型的蛋白质及多肽巯基 PEG 化试剂, N-马来酰亚胺氨基正己酸-mPEG 酯, 用于改造蛋白质及多肽的溶解性, 稳定性和免疫原性等。随着生物医学及基因工程技术的发展, 大量的药用 PEG 化蛋白、多肽等的制备和生产, 本发明提供的 PEG 代试剂, 方法简便, 成本低, 具有广阔的应用前景。

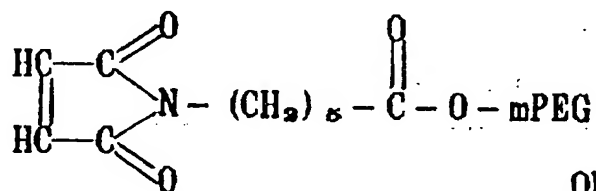


(BJ)第 1456 号

# 权 利 要 求 书

1. 一种新型的蛋白质及多肽巯基的聚乙二醇 (PEG) 化试剂, 其特征在于:

a. 由N-马来酰亚胺基正己酸与聚乙二醇 (mPEG-OH) 的羟基直接缩合成N-马来酰亚胺基正己酸-mPEG酯, 结构式:



其中  $m = \text{CH}_3 -$ ;  $\text{PEG} = \text{---} \begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ | \quad | \\ \text{CH} - \text{CH} \end{array} \text{---}$ ;

b. 缩合反应的温度为  $-20-10^\circ\text{C}$ ;

c. 二甲氨基吡啶 (DMAP) 为催化剂; DCC为缩合剂。

2. 根据权利要求1a所述合成的N-马来酰亚胺基正己酸-mPEG酯, 其特征在于它能直接用于蛋白质、多肽、氨基酸巯基的PEG化, 并包括用于含巯基的其它化合物的PEG化。

3. 根据权利要求1a所述的使用的聚乙二醇 (mPEG-OH), 它的分子量为2000—20000。

## 一种新型的蛋白质及多肽巯基聚乙二醇 (PEG) 化试剂

近年来, 聚乙二醇 (PEG) 被广泛用于对天然蛋白或重组蛋白的化学修饰, 以期改造蛋白的溶解性, 稳定性和免疫原性等。双功能试剂N-马来酰亚胺基正己基酸邻硝基对磺酸基苯酯 (Mal-sac-NHSA) 常用来连接蛋白或多肽与PEG-NH<sub>2</sub> [Aldwin lois, Danute E. Nitecki: Analytical Biochem. 1987 164, 494. Robert J. Goodson, Nandini V. Katre: Bio/Technology 1990, 8, 343]。

使用符号说明:

PEG 是  $\text{—} \begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ | \quad | \\ (\text{CH} - \text{CH})_n \end{array} \text{—}$ , 聚乙二醇, 长链高分子聚合物。

mPEG-OH PEG一端已甲基化, 另一端是羟基。

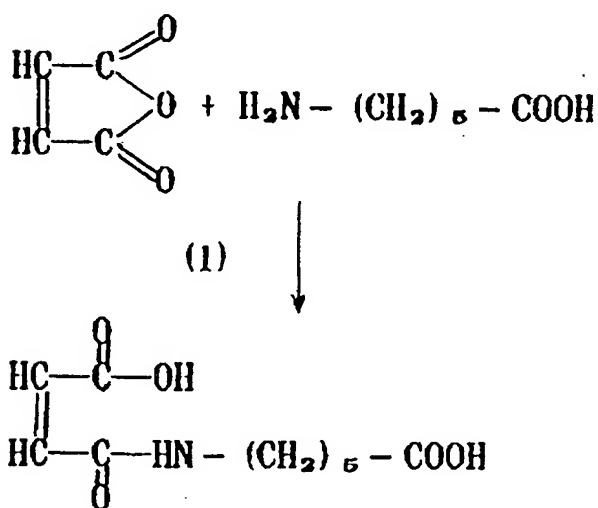
mPEG-NH<sub>2</sub> PEG一端已甲基化, 另一端是氨基。

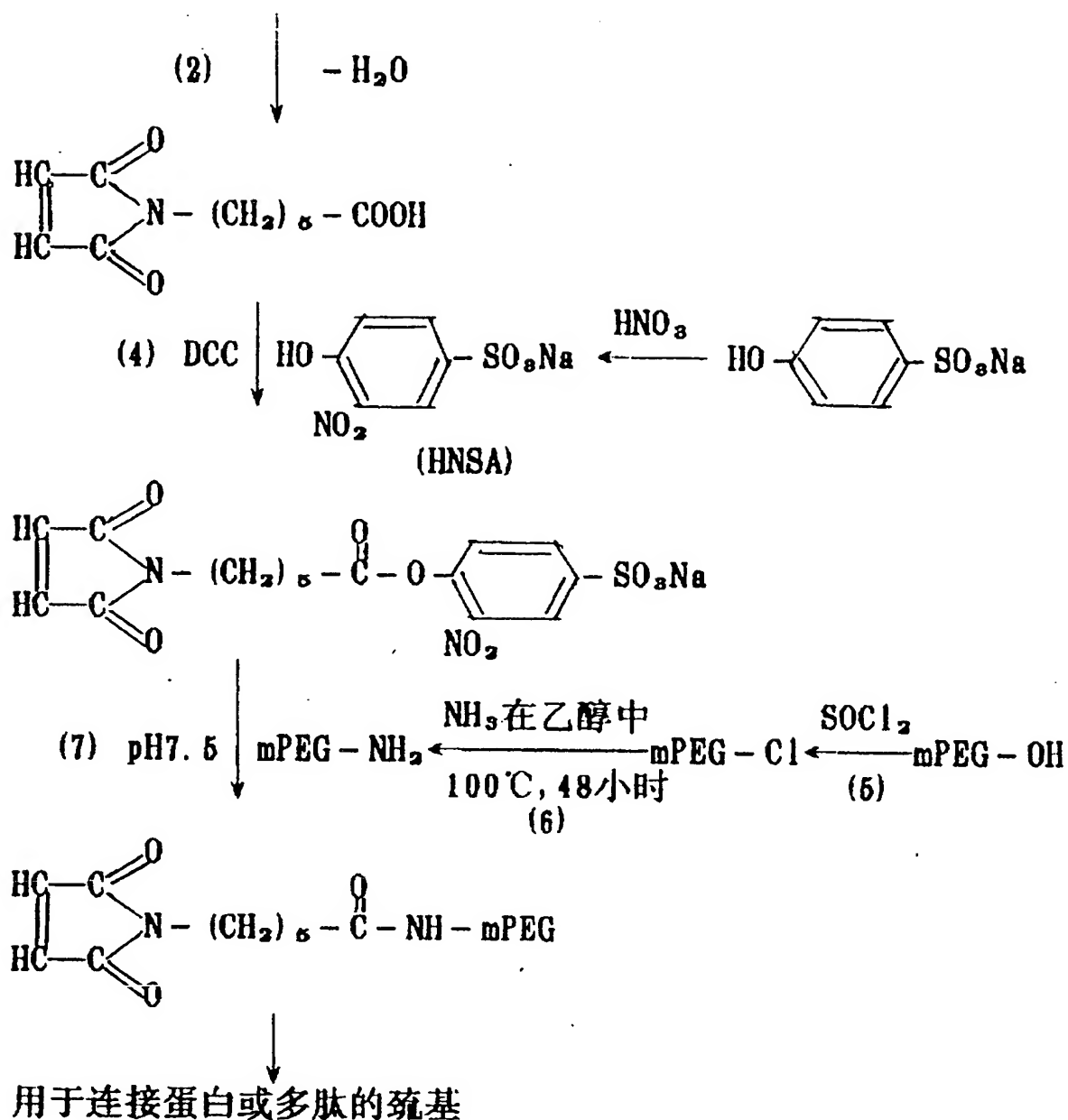
本发明中称PEG化, 是指mPEG化。

DCC 二环己基碳二亚胺。

DMAP 二甲氨基吡啶。

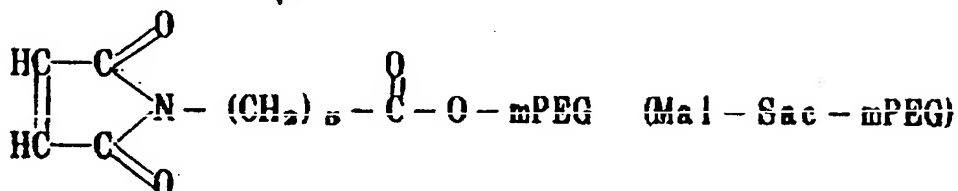
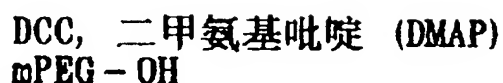
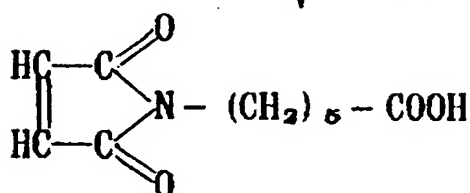
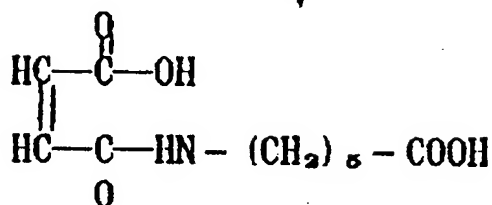
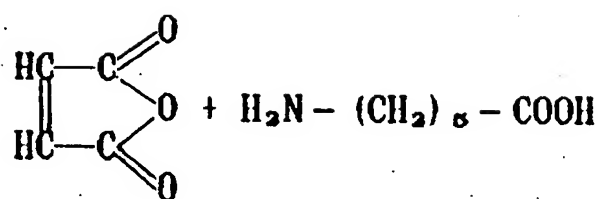
现有技术是这样的:





上述试剂制备以及由PEG合成PEG-NH<sub>2</sub>等步骤繁杂，条件苛刻  
 [Manfred Mutter: Tetrahedron Letters 1987, 31, 2839. A. F. Buchmann, et al: Makromolekular Chemie, 1981, 182(4-6), 1379. Michele Leonard et al: Makromolekular. Chemie 1988, 189, 1809. Norbert Dereu: Synthetic Communitions 1991, 21(1), 85. Ruth King: J. Chem. Soc, 1921, 119, 2105].

本发明设计的一条路线，可方便地合成另一种新的蛋白巯基PEG化试剂，步骤如下：



用于连接蛋白或多肽的巯基

本发明的特点是合成的N-马来酰肼至胺基正己酸直接与mPEG-OH缩合反应,从而避开了HNSA及mPEG-NH<sub>2</sub>的合成,使步骤大为简化,反应条件温和,且产率高,产物纯化方便,大大降低了生产成本。将本发明合成的PEG化试剂用于牛血清白蛋白(BSA)及基因重组γ-干扰素(rIFN-γ)的反应的结果表明,该试剂的活性高,选择性强,可广泛用于蛋白、多肽的巯基PEG化修饰,尤其是用于定点修饰。随着生

物医学及基因工程技术的发展和深入，大量的药用PEG化蛋白、多肽的制备和生产，本发明的巯基PEG化试剂具有很好的应用价值。

本发明的具体步骤在下述实施例中详细描述：

附图说明：

图1. Mal-Sac-PEG紫外吸收。

图2. PEG-BSA的SDS-PAGE电泳图。

M. 标准分子量蛋白

1. BSA对照样品
2. 3. 低修饰 PEG-BSA混合样品。
4. 高修饰 PEG-BSA混合样品。

图3. PEG-IFN- $\gamma$ 的SDS-PAGE电泳图。

M. 标准分子量蛋白

1. 97CyS-IFN- $\gamma$ 包涵体。
2. 修饰PEG-97CyS-IFN- $\gamma$ 样品。
3. 131CyS-IFN- $\gamma$ 包涵体。
4. 修饰PEG-131CyS-IFN- $\gamma$ 样品。
5. 修饰PEG-97CyS-IFN- $\gamma$ 样品[含二巯基苏糖醇(DTT) 30毫克分子]。

实施例1. N-马来酰亚胺基正己酸的制备

马来酸酐10克(0.1克分子)和氨基正己酸13.1克(0.1克分子)在100ml醋酸中，室温下回流4小时，补加200ml醋酸，用水分离器分去水份，继续回流过夜。然后真空抽去醋酸，油状物用15ml氯仿溶解，过滤，浓缩，上硅胶柱层分离(以氯仿：醋酸=95：5液平衡)，得N-马来酰亚胺氨基正己酸10克。

实施例2. N-马来酰亚胺氨基正己酸-mPEG酯的制备

取1克马来酰亚胺氨基正己酸和5克mPEG-OH(分子量5000) 0.001

克分子缩合；以二氯甲烷作溶剂，在二甲氨基吡啶 (DMAP) 与DCCI存在下，温度-20—10℃，反应4小时或过夜。混合物经乙醚沉淀，乙醇重结晶，再经Sephadex G-25柱进一步纯化，可得纯品冻干粉5克，置-20℃保存。

### 实施例3. N-马来酰亚胺氨基正己酸-mPEG酯的鉴定

#### 产物鉴定:

产品经紫外光谱(图1)扫描分析，符合结构式。根据其数据定量计算，PEG活性产率可达90%以上，产物溶于水及二氯甲烷，-20℃保存2个月，活性稳定。

### 实施例4. N-马来酰亚胺氨基正己酸-mPEG酯的应用

牛血清白蛋白(BSA)经DTT处理后，与新合成的试剂在pH6.0，室温下反应。产物的SDS-PAGE电泳图谱(图2)表明，有一条或多条修饰带。

另外，通过基因突变方法，在r-IFN中引入一个半胱氨酸，用上述方法修饰，可得50%-80%率的修饰产物1PEG-IFN- $\gamma$  (数据见图3)。



# 说明书附图

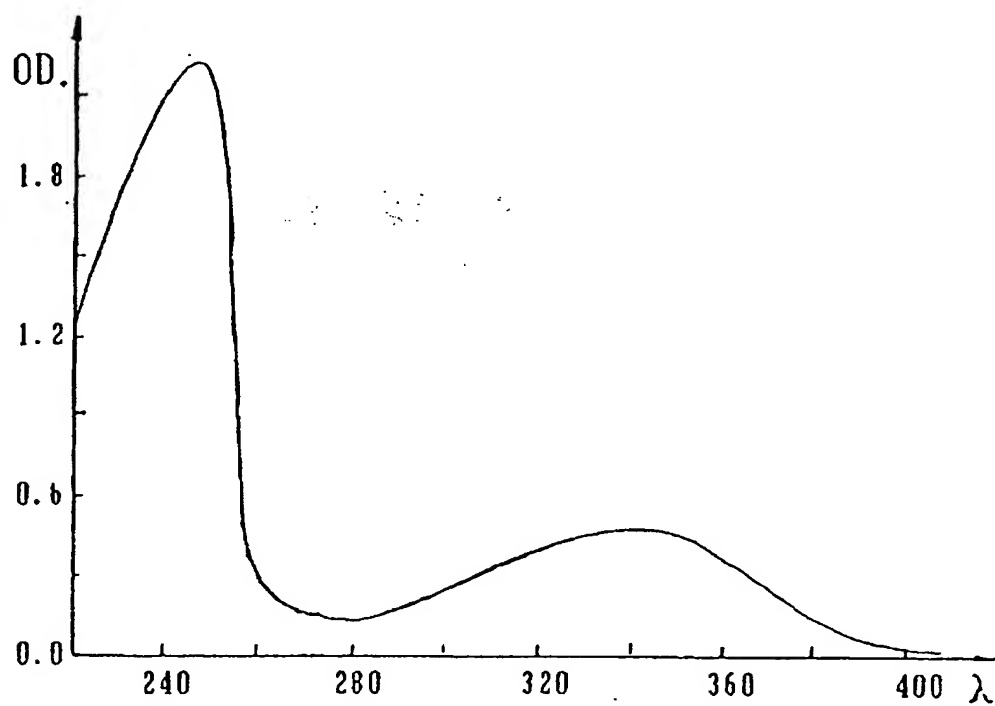


图 1

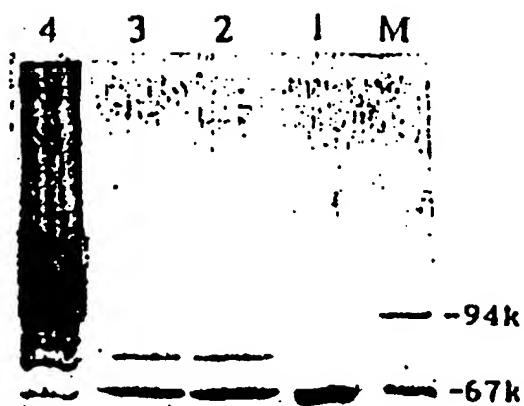


图 2

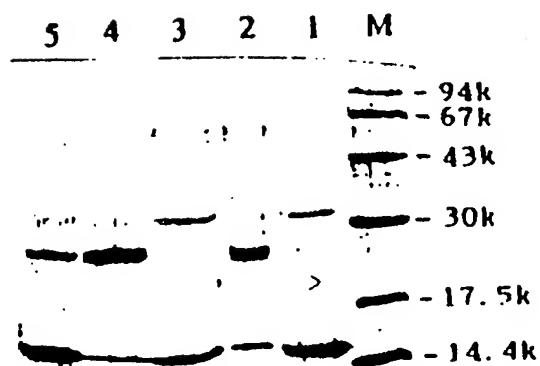


图 3

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**